

生物餌料の培養技術に関する研究 (シャコガイ共生藻の大量培養技術開発研究)

玉城 信・岩井憲司(沖縄県水産試験場八重山支場)

I. 目的・背景

沖縄県の採貝漁業及び貝類養殖業の重要対象種であるシャコガイ類の種苗生産時における最も大きな減耗期は、初期殻頂期仔貝と共生藻との共生関係が成立する時期である。^{1,2)} 共生藻は、主な餌料であると同時にシャコガイ類の生存に直接関与している藻類である。現状では共生藻の培養手法が確立されていないため多くの成貝を犠牲にし、その外套膜をすりつぶして採取した共生藻を仔貝に投与しているが、良好な状態で投与できていない。^{1,3)} この研究では共生藻の保存、培養条件を確立すると共に細胞形態変化及び他種シャコガイとの共生機構を解明し、シャコガイ種苗生産技術の高度化を図る。

II. 方法

1. 継代培養条件の検討

元種単離培養試験、雑藻混入防止試験、初代培養試験、継代培養試験を実施した。表1に培地組成を示した。

(1) 元種単離培養試験

表2に元種単離培養試験方法を示した。元種となる共生藻は種苗生産したヒレジャコ及びヒレナシジャコの外套膜表皮部分より取り出し、¹⁾ 以下の方法で採取後、振盪培養し、共生藻の増殖状況及び夾雑物混入の有無を調べた。

ピペット法は、外套膜表皮の部分を薄く剥ぎ、洗浄後、滅菌海水と共にすりつぶして得られた元種原液を希釈後、パスツールピペットで採取した。^{4,5,6,7)}

寒天平板法は、寒天に元種試料を塗布した。^{5,7)}

遠心分離法は、採取直後に遠心分離器にかけ、上澄みを除去した沈殿物から採取した。

初期仔貝洗浄法は、共生の成立したヒレジャコ及びヒレナシジャコ初期仔貝(日令15~30)をストレプトマイシン硫酸塩(以下マイシン)、二酸化ゲルマニウム(以下ゲルマニウム)、次亜塩素酸ナトリウム(以下カルキ)、ジクワット・パラコート液剤(以下パラコート)で浸漬⁴⁾、洗浄後、培養器に収容した。^{3,9)} 仔貝の殻及び軟体部表面の夾雑物を除去し、且つ培養器内で死亡仔貝体内から脱出した共生藻に影響を与えない薬品種類、濃度及び薬浴時間を探索した。

希釈法は、希釈後、1細胞/1容器ずつ採取した。^{5,7)} 培養器は、寒天平板法以外では、ねじ口試験管(12ml)及び三角フラスコ(100ml)を用いた。

(2) 雑藻混入防止試験

表3に雑藻混入防止試験の方法を示した。外套膜を薄く剥ぎ、すりつぶす前に外套膜表皮の前処理方法を検討した。⁵⁾ 従来用いている水以外にエタノール、ゲルマニウム、カルキで洗浄した。イソジン・カルキ処理は、カルキで殻洗浄したシャコガイをイソジン薬浴し、切り取った外套膜をカルキで洗浄した。¹⁰⁾

表1 培地組成

培地名	組 成																																
P-ES改変 培地	<table border="0"> <tr> <td>海水¹⁾</td> <td>1,000ml</td> <td>※これは従来から沖縄</td> </tr> <tr> <td>No.1液 ノリシード液²⁾</td> <td>1ml</td> <td>県水産試験場八重山</td> </tr> <tr> <td>No.2液 L-シスチン液³⁾</td> <td>1ml</td> <td>支場でシャコガイ種</td> </tr> <tr> <td>No.3液 ビタミン混合液⁴⁾</td> <td>1ml</td> <td>苗生産時に使用して</td> </tr> <tr> <td>No.4液 ストレプトマイシン液⁵⁾</td> <td>1ml</td> <td>いる培地である。</td> </tr> </table>	海水 ¹⁾	1,000ml	※これは従来から沖縄	No.1液 ノリシード液 ²⁾	1ml	県水産試験場八重山	No.2液 L-シスチン液 ³⁾	1ml	支場でシャコガイ種	No.3液 ビタミン混合液 ⁴⁾	1ml	苗生産時に使用して	No.4液 ストレプトマイシン液 ⁵⁾	1ml	いる培地である。																	
	海水 ¹⁾	1,000ml	※これは従来から沖縄																														
	No.1液 ノリシード液 ²⁾	1ml	県水産試験場八重山																														
No.2液 L-シスチン液 ³⁾	1ml	支場でシャコガイ種																															
No.3液 ビタミン混合液 ⁴⁾	1ml	苗生産時に使用して																															
No.4液 ストレプトマイシン液 ⁵⁾	1ml	いる培地である。																															
<p>1) 0.01μm 中空糸膜で濾過した超精密濾過海水を熱処理</p> <p>2) 海苔糸状体発育促進総合栄養剤ノリシード(第一製網社製)原液</p> <p>3) L-シスチン 0.5g 蒸留水 1,000ml</p> <p>4) ビタミンB₁₂^{a)} 2mg 塩酸チアミン^{b)} 100mg ビオチン^{c)} 1mg パンテノール^{d)} 100mg 蒸留水 1,000ml</p> <p>5) ストレプトマイシン硫酸塩(和光純薬社製) 10g 蒸留水 1,000ml</p> <p>※2).3).5) は調合後冷暗所保存、4) は調合後凍結保存</p>																																	
<p>a) アデマイド注射液1000(旭化成工業社製) 1mlを2アンプル 2ml中コバマミド(補酵素型ビタミンB₁₂) 1mg含有</p> <p>b) メタボリン注射液(武田薬品工業社製) 1mlを2アンプル 2ml中塩酸チアミン(ビタミンB₁塩酸塩) 50mg含有</p> <p>c) ビオチン注射液(扶桑薬品工業社製) 2mlを1アンプル 2ml中ビオチン(ビタミンH) 1mg含有</p> <p>d) パントール注射液100mg(トーアエイヨー社製) 1mlを1アンプル 1ml中パンテノール 100mg含有</p>																																	
ダイゴ [®] IMK 培地	<table border="0"> <tr> <td>超精密濾過海水を高圧滅菌処理後濾過した海水</td> <td>1,000ml</td> </tr> <tr> <td>海産微細藻類用ダイゴIMK培地(日本製薬社製)⁶⁾</td> <td>252mg</td> </tr> <tr> <td>ストレプトマイシン液⁵⁾</td> <td>1ml</td> </tr> </table>	超精密濾過海水を高圧滅菌処理後濾過した海水	1,000ml	海産微細藻類用ダイゴIMK培地(日本製薬社製) ⁶⁾	252mg	ストレプトマイシン液 ⁵⁾	1ml																										
	超精密濾過海水を高圧滅菌処理後濾過した海水	1,000ml																															
海産微細藻類用ダイゴIMK培地(日本製薬社製) ⁶⁾	252mg																																
ストレプトマイシン液 ⁵⁾	1ml																																
6) 処方	<table border="0"> <tr> <td>NaNO₃</td> <td>200mg</td> <td>CoSO₄·7H₂O</td> <td>0.014mg</td> </tr> <tr> <td>Na₂HPO₄</td> <td>1.4mg</td> <td>Na₂MoO₄·2H₂O</td> <td>0.0073mg</td> </tr> <tr> <td>K₂HPO₄</td> <td>5mg</td> <td>CuSO₄·7H₂O</td> <td>0.0025mg</td> </tr> <tr> <td>NH₄Cl</td> <td>2.68mg</td> <td>H₂SeO₃</td> <td>0.0017mg</td> </tr> <tr> <td>Fe-EDTA</td> <td>5.2mg</td> <td>塩酸チアミン</td> <td>0.2mg</td> </tr> <tr> <td>Mn-EDTA</td> <td>0.332mg</td> <td>ビオチン</td> <td>0.0015mg</td> </tr> <tr> <td>Na₂-EDTA</td> <td>37.2mg</td> <td>ビタミンB₁₂</td> <td>0.0015mg</td> </tr> <tr> <td>ZnSO₄·7H₂O</td> <td>0.023mg</td> <td>MnCl₂·4H₂O</td> <td>0.18mg</td> </tr> </table>	NaNO ₃	200mg	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.014mg	Na ₂ HPO ₄	1.4mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0073mg	K ₂ HPO ₄	5mg	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0025mg	NH ₄ Cl	2.68mg	H ₂ SeO ₃	0.0017mg	Fe-EDTA	5.2mg	塩酸チアミン	0.2mg	Mn-EDTA	0.332mg	ビオチン	0.0015mg	Na ₂ -EDTA	37.2mg	ビタミンB ₁₂	0.0015mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.023mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18mg
NaNO ₃	200mg	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.014mg																														
Na ₂ HPO ₄	1.4mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0073mg																														
K ₂ HPO ₄	5mg	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0025mg																														
NH ₄ Cl	2.68mg	H ₂ SeO ₃	0.0017mg																														
Fe-EDTA	5.2mg	塩酸チアミン	0.2mg																														
Mn-EDTA	0.332mg	ビオチン	0.0015mg																														
Na ₂ -EDTA	37.2mg	ビタミンB ₁₂	0.0015mg																														
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.023mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18mg																														

表2 元種単離培養試験方法

元種単離方法	ピペット法	元種原液を、希釈洗浄後、40cells/mlに調整し、試料とした。テープを貼り、メスでくり抜き、パスツールピペット1滴(0.025ml)分の溝状穴を確保した分離用スライドグラスに試料を満たした。位相差顕微鏡下(×200)で観察し、正常な共生藻が1個のみ観察され、且つ夾雑物が無いことを確認し、ねじ口試験管に採取。
	寒天平板法	1.5%寒天(寒天抹15g/P-ES改変培地1L)をシャーレに作成し、元種試料を塗布。
	遠心分離法	元種原液を遠心分離器(500回転/分、5分)にかけ、沈殿物に海水を加え攪拌し、再び遠心器にかける。これを10回繰り返す、上澄みを除去した沈殿物をねじ口試験管に採取。
	初期仔貝洗浄法	共生成立初期仔貝を以下の薬品で浸漬、洗浄後、ねじ口試験管に仔貝を1個体毎収容。 ストレプトマイシン硫酸塩10g/蒸留水1L、二酸化ゲルマニウム10g/蒸留水1Lを原液とし、仔貝と共にマイシン10~100ml/L(100~1000ppm)、ゲルマニウム10~150ml/L(100~1500ppm)を10ml時計皿に入れ、パスツールピペットで10回換水洗浄直後及び1~7時間浸漬。 カルキ 次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素0.6~3.6%)溶液に仔貝を2~60分浸漬後、パスツールピペットを用い、海水洗浄。 パラコート ジクワット・パラコート液剤(パラコート5%)を原液とし、仔貝と共に1ml/L(50ppm)~原液(50,000ppm)を10ml時計皿に入れ1~5時間浸漬。
	希釈法	元種原液の細胞密度を計数し、1cells/mlに希釈後、1cell/1本になるように、ねじ口試験管に採取。
元種試料	ピペット法、遠心分離法及び希釈法：ヒレジャコ外套膜採取 寒天平板法：ヒレジャコ再通気培養 初期仔貝洗浄法：ヒレジャコ及びヒレナシジャコ共生初期仔貝(日令15~30)	
培養形態	主に振盪培養(寒天平板法は異なる)	
培養光条件	15~30 μmol/m ² /s	
培養水温	27~29℃	
夾雑物混入の確認及び継代	肉眼確認(培養液の色付き)後、顕微鏡観察し、藻細胞の正常な増殖及び夾雑物が無いことを確認し、継代し、振盪培養。肉眼観察時に共生藻以外の他色素(緑、赤)が確認された場合、若しくは、2ヶ月後も培養液が透明な場合は、廃棄。	